QUANTA Plex™ Celiac IgA Profile 708940

Para utilização em diagnóstico *In Vitro*

Complexidade CLIA: Elevada

Aplicação Diagnóstica

O QUANTA Plex™ Celiac IgA Profile é um imunoensaio de fluorescência para a detecção semi-quantitativa de auto-anticorpos os anticorpos da transglutaminase tecidular anti-humana da IgA (Imunoglobulina A) (h-tTG), e peptídeo de gliadina anti-desamidado (DGP) e a detecção de uma quantidade insuficiente de IgA no soro humano. A presença destes anticorpos, juntamente com outras descobertas laboratoriais e clínicas, é uma ajuda no diagnóstico da enteropatia sensível ao glúten da doença celíaca. A IgA insuficiente indica que não existe IgA suficiente para permitir a detecção de IgA anti-h-tTG ou anti-DGP.

Resumo e Explicação do teste

A doença celíaca é uma condição crónica, cujas características principais incluem a inflamação e o esmagamento característico da mucosa intestinal, resultando numa síndroma de má absorção conhecida como uma enteropatia sensível ao glúten. A etiologia exacta da doença permanece desconhecida, à excepção da gliadina, fracção solúvel do álcool de glúten do trigo, que é claramente o agente tóxico.[1,2]

recentemente, têm sido sugeridos testes sorológicos para anticorpos de anti-gliadina, anti-endomisial e anti-tTG para examinar os doentes com enteropatia sensível ao glúten, assim como para controlar a conformidade dietética.[3-5] A Sociedade Europeia de Gastrenterologia e Nutrição Pediátrica recomendou a utilização de marcadores anticorpos, tais como os anticorpos da anti-gliadina e anti-endomisial para reduzir o número de biópsias necessárias para fazer um diagnóstico.[5]

O antigénio endomisial identificou-se como a enzima de ligação cruzada com a proteína tTG.[6] Os procedimentos específicos do ELISA integrando tTG como o antigénio proporcionam uma alternativa fiável e objectiva aos ensaios tradicionais por imunofluorescência utilizando finas secções de esófago de primata como substrato.[6-8] O antigénio h-tTG tem sido produzido por tecnologia recombiante, e pode ter certas vantagens comparando com o antigénio do fígado de porquinho-da-índia.[7,8]

Trabalhos recentes revelaram que os anticorpos da gliadina reactiva de doentes celíacos se ligam a um número muito limitado de epítopos específicos da molécula de gliadina.[9-11] Além disso, estes estudos revelam que a desamidação selectiva da gliadina pela enzima associada à doença celíaca, tTG, resulta numa ligação aumentada dos anticorpos anti-gliadina. Os ensaios que utilizam peptídeos de gliadina desamidados possuem uma maior precisão de diagnóstico para a doença celíaca, do que os ensaios anti-gliadina e mesmo até os anti-tTG.[12,13] Adicionalmente, estes anticorpos são de interesse para acompanhar a actividade da doença ao longo do tempo e para controlar a adesão a uma dieta sem glúten.[13]

Uma quantidade significativa de doentes celíacos tem a IgA deficiente.[14-17] Assim, uma estratégica de rastreio sensível para as populações em risco inclui testes para anticorpos IgA anti-DGP e anti-h-tTG, assim como testes para a deficiência selectiva de IgA.

A dermatite herpetiforme (DH) é uma doença de pele que, tal como a doença celíaca, é causada pela ingestão da proteína do trigo. A maioria dos doentes com DH apresenta atrofia das vilosidades jejunais idêntica à encontrada nos casos de doença celíaca e uma dieta rigorosa sem glúten melhora, tanto as lesões intestinais como as dermatológicas.[1,2,18] Os métodos sorológicos actuais como, os ensaios endomisiais de gliadina nativa e tTG apresentam desempenhos decepcionantes quando usados para a DH, com sensibilidades de apenas 60-75%[18], quando comparados com os valores de 95% ou superiores para a doença celíaca.[3-8]

QUANTA Plex™ Celiac IgA Profile é um teste de rastreio para anticorpos encontrados em pessoas com a doença celíaca e com dermatite herpetiforme relacionada com distúrbios de sensibilidade ao glúten. Permite a detecção simultânea de anticorpos IgA, quer para um peptídeo de gliadina desamidado sintético quer para tTG humana recombinante e, ao mesmo tempo, detecta uma deficiência de IgA.

Princípio do método

O h-tTG recombinante e o DGP sintético ligam-se a diferentes esferas, coloridas por fluorescência. As duas esferas revestidas por antigénio diferentes, assim como uma esfera revestida anti-IgA e uma esfera revestida de IgA são misturadas em conjunto e colocadas em poços de uma placa de micropoços sob condições que conservam os antigénios no seu estado reactivo. Adicionam-se os controlos pré-diluídos, um controlo sem soro, consistindo em diluente da amostra sem qualquer soro adicionado e soro de doentes diluídos a micropoços separados, permitindo que qualquer anticorpo DGP ou h-tTG presente se ligue aos antigénios imobilizados nas esferas, assim como liberta IgA para se ligar à esfera anti-IgA. De seguida, adiciona-se uma IgA anti-humana conjugada com uma sonda de fluorescência a cada micropoço. Uma segunda incubação permite ao conjugado IgA anti-humano fluorescente ligar-se a quaisquer anticorpos dos doentes que se ligam aos antigénios nas esferas ou são capturados pela esfera anti-IgA, e à IgA na esfera de IgA. As amostras são depois medidas no analisador de fluxo Luminex™. Este analisador 100 ou 200 (citómetro) de fluxo tem capacidade para separar a cor de cada esfera, assim como para medir a intensidade da fluorescência do conjugado em cada esfera.[19] A intensidade da fluorescência na esfera é proporcional à quantidade de conjugado ligado, que por sua vez é proporcional à quantidade de anticorpos do doente, ligados às esferas revestidas por antigénio ou à esfera anti-IgA.Cada anticorpo pode ser semi-quantificado através da comparação da intensidade de fluorescência da amostra do doente com a intensidade do Calibrador correspondente. Através da comparação das Unidades Luminex calculadas da esfera anti-IgA e da esfera anti-IgA pode identificar-se um soro com deficiência selectiva de IgA, como abaixo descrito na interpretação dos resultados. Estas duas esferas de controlo também podem utilizar-se para assegurar que os resultados falsos negativos decorrentes de um erro operacional sejam detectados, como descrito no Controlo de Qualidade. Note que estas esferas apresentam os mesmos resultados quando uma pessoa é deficiente em IgA, assim como quando não se adiciona soro ao poço.

Reagentes

1. Placa de micropoços de poliestireno (prateado estampado na cor), 12 (1 x 8) tiras de micropoços com suporte, contendo esferas de 4 "cores" diferentes. Cada uma das esferas coloridas está revestida com um antigénio purificado diferente (h-tTG, DGP, anti-IgA ou IgA), numa embalagem de folha de alumínio contendo exsicantes
2. QUANTA Plex™ Negative Control, 1 frasco de tampão contendo conservante e soro humano sem anticorpos IgA humanos contra antigénios no Celiac IgA Profile, pré-diluído, pronto a utilizar, 1,2mL
3. Celiac IgA Calibrator, 1 frasco de tampão contendo conservante e anticorpos de soro humano contra os antigénios h-tTG e DGP, pré-diluído, pronto a utilizar, 1,2mL
4. Celiac IgA Positive Control, 1 frasco de tampão contendo conservante e anticorpos de soro humano contra os antigénios h-tTG e DGP, pré-diluído, pronto a utilizar, 1,2mL
5. Diluente para Amostras HRP, 1 frasco de cor rosa, contendo solução salina com tampão Tris, Tween 20, estabilizadores proteicos e conservantes, 50mL (também utilizado como Isento de Soro)
6. Conjugado IgA marcado com fluorescência (cabra), anti-IgA humana (cadeia alfa específica), 1 frasco castanho – pó liofilizado, contendo tampão, estabilizadores proteicos e conservantes. Consulte a secção de Métodos para as instruções de reconstituição
7. QUANTA Plex™ Conjugate Diluent, 1 frasco – de cor rosa, contendo tampão, estabilizadores proteicos e conservantes, 7mL

Advertências

1. ADVERTÊNCIA: Este produto contém um químico (0,02% cloranfenicol) no diluente da amostra considerado como cancerígeno no Estado da Califórnia.
2. Todo o material de origem humana utilizado na preparação dos controlos deste produto foi testado e deu resultados negativos para métodos aprovados pela FDA para anticorpos anti HIV, HBsAg e HCV. Contudo, nenhum teste pode garantir com certeza absoluta a ausência de HIV, HBV, HCV ou outros agentes infecciosos. Assim, QUANTA Plex™ Negative Control**,** e Celiac IgA Calibrator e Celiac IgA Positive Control devem ser manipulados como se fossem material potencialmente infeccioso.[20]
3. A azida de sódio é utilizada como conservante. Este produto é venenoso e pode ser tóxico se for ingerido ou absorvido pela pele ou pelos olhos. A azida de sódio pode reagir com componentes de chumbo ou cobre das canalizações formando azidas metálicas explosivas. Por esta razão, ao deitar fora os restos de reagentes é necessário deixar correr água em quantidade abundante para evitar a formação destas substâncias.
4. Usar equipamento de protecção apropriado para trabalhar com os reagentes.
5. Os salpicos de reagentes devem ser limpos imediatamente. Observar todas as regulamentações ambientais nacionais e locais relativas à eliminação de resíduos.

Precauções

1. Utilizar somente para diagnóstico *In Vitro*.
2. A substituição de componentes do dispositivo por outros que não pertençam a este sistema pode originar resultados inconsistentes. Todos os controlos são específicos para o número de lote do kit.
3. A adaptação, total ou parcial, deste teste para processadores automatizados e outros aparelhos de processamento de líquidos pode dar origem a diferenças nos resultados obtidos nos testes por técnica manual. É da responsabilidade de cada laboratório garantir que o seu procedimento automático dá origem a resultados dentro dos limites aceitáveis.
4. Existem vários factores que influenciam o desempenho do ensaio. Entre estes inclui-se a temperatura inicial dos reagentes, a temperatura ambiente, a precisão e reprodutibilidade da técnica de pipetagem, a reprodutibilidade da técnica de mistura, o analisador de fluxo Luminex™ 100 ou 200 utilizado para ler os resultados e a duração dos tempos de incubação durante o ensaio. É necessária especial atenção à consistência para se obterem resultados rigorosos e reprodutíveis.
5. O protocolo deve ser criteriosamente respeitado.
6. Uma selagem inadequada da saqueta com tiras de micropoços e dessecantes pode provocar a degradação do antigénio e baixa precisão dos resultados.
7. Pode ser observada uma fluorescência inaceitavelmente baixa depois de múltiplas utilizações de um único frasco de conjugado de fluorescência durante algum tempo. É importante cumprir todos os procedimentos recomendados para manipulação dos conjugados fluorescentes, visando prevenir esta ocorrência.
8. A contaminação química do conjugado fluorescente pode resultar de uma limpeza ou lavagem inadequadas do equipamento ou instrumentos. Resíduos de substâncias químicas vulgares de laboratório tais como formalina, lixívia, etanol ou detergente irão provocar degradação do conjugado fluorescente no decurso do tempo. Lave exaustivamente todo o equipamento ou instrumentos com água destilada ou desionizada depois da utilização de desinfectantes/produtos de limpeza químicos.

Precauções particulares de conservação

1. Conservar todos os reagentes a 2-8º C. Não congelar. Os reagentes permanecem estáveis até à data de validade indicada, quando armazenados e manipulados conforme descrito no protocolo.
2. As tiras dos micropoços revestidas com antigénios que não forem logo utilizadas, devem ser seladas na embalagem protectora original com dessecantes e conservadas a 2-8º C.

Colheita da amostra

Este procedimento deve ser efectuado com uma amostra de soro. A adição de azida ou de outros conservantes às amostras do teste pode interferir negativamente nos resultados. As amostras de soro com contaminação bacteriana, que sofreram tratamento térmico ou contendo partículas visíveis não devem ser utilizadas. Amostras ou soro muito hemolizados ou lipémicos devem ser evitados.

Após a colheita, o soro deve ser separado do coágulo. O documento H18-A3 da CLSI (anteriormente NCCLS) recomenda as seguintes condições de armazenamento para as amostras: 1) Não armazenar as amostras à temperatura ambiente durante mais de 8 horas. 2) Se o teste não for concluído num prazo de 8 horas, guardar a amostra a 2-8º C. 3) Se o teste não for concluído num prazo de 48 horas, ou se houver transporte da amostra, congelar a –20º C ou a uma temperatura inferior. As amostras congeladas devem ser bem agitadas depois de descongelarem e antes de serem testadas.

Procedimento

Material fornecido

1 Placa de micropoços de Celiac IgA Profile, (12-1 x 8 poços), com suporte
1 1,2 mL pronto a utilizar QUANTA Plex™ Negative Control, pré-diluído
1 1,2 mL pronto a utilizar Celiac IgA Calibrator, pré-diluído
1 1,2 mL pronto a utilizar Celiac IgA Positive Control, pré-diluído
1 50 mL Diluente da amostra HRP (também utilizado como Isento de Soro)
1 Conjugado IgA marcado com fluorescência (cabra), anti-IgA humana
1 7 mL QUANTA Plex™ Conjugate Diluent

Material adicional necessário mas não fornecido

Micropipetas de 5 e 500 µL
Pontas descartáveis para as micropipetas
Tubos de teste para diluições de amostras de doentes, volume de 1-4 mL
Água destilada ou desionizada
Fluido de preservação de fluxo analisador Luminex™ 100 ou 200
Analisador de fluxo Luminex™ 100 ou 200
Pipetador electrónico de 8 canais para a dispnesa de 5, 30, 45, 50 e 60µL ou dispositivo de pipetagem/diluição automatizado

Utilização do Analisador de Fluxo Luminex™ 100 ou 200

1. Consulte o manual do utilizador fornecido com o Luminex™ para instruções detalhadas sobre o funcionamento do analisador de fluxo Luminex™ 100 ou 200 e a Versão Sistema Integrado (IS) do programa de software do Luminex™ ou Versão 2,0 ou superior. Para mais informações e para a resolução de problemas com este ensaio, contacte a assistência técnica da INOVA Diagnostics, Inc. na morada ou número de telefone presentes na última página do Folheto Informativo. Seguem-se instruções resumidas para funcionamento do analisador de fluxo Luminex™ 100 ou 200.
2. Calibre o Luminex™ utilizando as esferas de Calibração e Controlo da fornecidas pela Luminex Corporation pelo menos uma vez por mês e confirme que a calibração tem sucesso. Para além disso, calibre o Luminex™ se a temperatura de calibração delta for superior a 3 graus, se os controlos do ensaio estiverem fora do intervalo ou conforme for necessário.
3. Luminex™ demora 30 minutos a aquecer depois de ter sido ligado. Quando o período de aquecimento se concluir, efectue as operações de purga, irrigação com álcool e lavagem recomendadas pelo fabricante.
4. Utilizar a Versão do software IS, carregue o modelo "QP Celiac IgA Profile" e assegure-se de que todas as informações de lote estão correctas. Se for necessário, actualize as informações do lote. Os parâmetros no modelo são os seguintes: As cores das esferas são h-tTG = 27, DGP = 28, anti-IgA = 29, IgA = 30. Os eventos por esfera são 50, o tamanho da amostra para 50 µL, o débito para 60 µL/minuto (rápido) e o portão para aproximadamente 7500 a 17000, Utilizam-se os valores medianos para a Intensidade Média de Fluorescência (MFI).
5. Introduza os nomes da amostra manualmente, ou clicando em "Load Pa List".
6. Carregue a placa na plataforma XY do Luminex™.
7. Faça funcionar o Luminex™ clicando no botão "Start Plate".
8. Quando terminar o dia, execute as operações de sanear e embeber antes de desligar o instrumento.

Método: Antes de iniciar

1. Para programar informações para o equipamento automatizado, contacte a Assistência Técnica da INOVA Diagnostics, Inc.
2. Ligue o analisador de fluxo Luminex™ 100 ou 200, assegure-se de que aqueceu e efectue todas as operações de manutenção diárias conforme previamente descrito. Se for necessário, calibre o instrumento e confirme que a calibração teve sucesso.
3. Coloque todos os reagentes e amostras do doente à temperatura ambiente (20-26ºC) e misture bem.
4. Se o conjugado fluorescente de anti-IgA humana não tiver sido reconstituído, adicione 6mL de QUANTA Plex™ Conjugate Diluent ao frasco castanho contendo o pó liofilizado e rode o recipiente durante aproximadamente 30 segundos para dissolver o conteúdo. O conjugado fluorescente reconstituído permanece estável durante 3 meses entre 2 e 8ºC. **Não congele**.
5. Certifique-se de que o recipiente do fluido de preservação no Luminex™ está cheio de fluido de protecção disponível na Luminex Corporation e que o frasco de desperdícios está vazio.
6. Prepare uma diluição a 1:101 de cada amostra do doente adicionando 5µL de cada soro a 500µL de Diluente para Amostras HRP, e depois coloque no vórtice para misturar exaustivamente a solução. As amostras diluídas devem ser utilizadas no prazo de 8 horas depois da preparação. **NÃO DILUA** o QUANTA Plex™ Negative Control**,** o Celiac IgA Calibrator e o Positive Control.
7. A determinação da presença ou ausência de anticorpos IgA anti-h-tTG e anti-DGP utilizando unidades arbitrárias e a detecção selectiva da deficiência de IgA, requer dois poços para o Calibrador e um poço para cada Controlo Negativo, Positivo e Isento de Soro. Recomenda-se a execução das amostras em singleto.

Técnica

1. **Todos os reagentes devem ser colocados à temperatura ambiente (20-26°C) antes de começar o ensaio.** Coloque o número necessário de micropoços/tiras no suporte. **Volte imediatamente a colocar as tiras não utilizadas no saco contendo exsicantes e vede com firmeza para minimizar a exposição a vapor de água e luz.**
2. Adicionar 45µL de Diluente de Amostra HRP a cada micropoço que contenha uma **amostra do doente (e o Controlo sem Soro)**. Não adicionar Diluente de Amostra HRP aos quatro primeiros micropoços, uma vez que estes contêm o QUANTA Plex™ Negative Control, O Celiac IgA Calibrator (em duplicado) e o Celiac IgA Positive Control. **Não** adicione as amostras dos doentes diluídas aos micropoços neste momento.
3. Mantenha um das seguintes sequências de coordenação quando adicionar controlos, amostras e conjugado ao micropoços. Em virtude das amostras serem lidas sucessivamente, a uma taxa de aproximadamente 1 amostra a cada 19 segundos (ou uma tira de 8 poços em aproximadamente 2½ minutos) pelo Luminex™, as amostras dos doentes e também o conjugado devem ser adicionados aos micropoços a esta taxa, para minimizar

qualquer variação da frente para trás do ensaio. Se os controlos, amostras ou o conjugado forem adicionados um de cada vez, protele a adição destes ao próximo micropoço em 19 segundos. Se os controlos, amostras ou o conjugado forem adicionados 8 de cada vez a uma tira, protele cada adição à tira seguinte 2½ minutos. Estes dois esquemas de coordenação irão demorar aproximadamente 30 minutos para a adição de amostras a todas as 12 tiras de uma placa inteira e irão minimizar a variação da frente para trás do ensaio.

4. Submeter ao Vórtice, e depois adicionar 50µL de cada um dos controlos **pré-diluídos** seguintes: o QUANTA Plex™ Negative Controlno primeiro micropoço, o Celiac IgA Calibrator no segundo e no terceiro micropoços e o Celiac IgA Positive Control no quarto micropoço. Tem que ser utilizada uma pipeta electrónica quando se adicionarem manualmente as amostras e se misturarem as esferas. Utilize uma das sequências de coordenação para adicionar os controlos conforme descrito o passo 3. **Pipete vigorosamente pelo menos 30 µL do QUANTA Plex™ Negative Control, do Celiac IgA Calibrator e o Positive COntrol, para cima e para baixo quatro vezes, de modo a misturar as esferas e os controlos em cada micropoço** O tempo de incubação de 30 minutos inicia-se depois de adicionar o QUANTA Plex™ Negative Control ao **primeiro** micropoço.
5. Prossiga imediatamente com o ensaio adicionando 5 µL do diluente da amostra HRP ao quinto poço (o controlo isento de soro) e 5 µL de soro do doente diluído nos restante micropoços adequados (nota: tal produz uma diluição final a 1:1010 do soro do doente). Mantenha a mesma sequência de coordenação utilizada no passo 4. **Misture a amostra do doente diluída e o HRP Diluente para Amostras no micropoço pipetando vigorosamente pelo menos 30 µL dos conteúdos do micropoço para cima e para baixo quatro vezes.** Prossiga com a coordenação da incubação durante 30 minutos a partir do momento da adição do QUANTA Plex™ Negative Control. Coloque a tira de micropoços à temperatura ambiente, numa superfície nivelada e afastada da luz solar directa durante o resto do período de incubação.
6. No final do primeiro período de incubação, adicione 50 µL do conjugado fluorescente a cada micropoço e **pipete vigorosamente pelo menos 60 µL do conteúdo do micropoço para cima e para baixo quatro vezes**. Para adicionar o conjugado, mantenha a mesma sequência de coordenação utilizada nos passos 4 e 5. O conjugado deve ser removido do frasco em condições assépticas padrão e utilizando boas técnicas de laboratório. Retire apenas do frasco a quantidade de conjugado necessária para o ensaio. **PARA EVITAR POTENCIAL CONTAMINAÇÃO MICROBIANA E/OU QUÍMICA, NUNCA VOLTE A COLOCAR CONJUGADO NÃO UTILIZADO NO FRASCO**. Incube as tiras de micropoços durante 30 minutos à temperatura ambiente, numa superfície nivelada e afastada da luz solar directa. O período de incubação inicia-se depois da **primeira** adição do conjugado.
7. No prazo de uma hora depois da conclusão da incubação de 30 minutos do conjugado fluorescente, leia a placa de Celiac IgA Profile no Luminex™ conforme detalhado na secção acima, “Utilização do Analisador de Fluxo Luminex™ 100 ou 200”.

Controlo de qualidade

1. O Celiac IgA Calibrator (em duplicado), o Celiac IgA Positive Control, o QUANTA Plex™ Controlo Negativo e o Controlo Isento de Soro devem executar-se com uma série de amostras para assegurar que todos os reagentes e procedimentos foram realizados adequadamente.
2. Note que o Celiac IgA Calibrator, o Celiac IgA Positive Control e o QUANTA Plex™ Negative Control estão pré-diluídos, pelo que não controlam os procedimentos associados às diluições de amostras.
3. Outros controlos podem ser testados de acordo com as directivas ou requerimentos locais e/ou nacionais ou de acordo com as disposições de organizações acreditadas. Outros controlos adequados podem ser preparados efectuando alíquotas de amostras de soro humano e conservando a $\leq$ -20ºC.
4. Para se considerar válidos os resultados do teste, tem de se cumprir todos os critérios abaixo listados. Se não se cumprir algum deles, deve considerar-se o teste inválido e repetir o ensaio. O valor, em Unidades Luminex (UL) do Calibrador para cada antigénio encontra-se no rótulo da caixa para esse kit. Consulte a fórmula na secção de Cálculo dos Resultados para determinar as UL do QUANTA Plex™ Negative Control, Celiac IgA Positive Control e dos Controlo Isentos de Soro.
   a. O valor do QUANTA Plex™ Negative Control tem de ser < 20 UL para h-tTG e DGP. Tem de ser entre 10 e 40 UL, tanto para as esferas de controlo IgA como para as anti-IgA.
   b. O valor do Celiac IgA Positive Control tem de ser $\geq$ 30 UL para h-tTG e entre 30 UL e 130 UL para DGP. Tem de ser entre 10 e 40 UL, tanto para as esferas de controlo IgA como para as anti-IgA.
   c. O valor do Controlo Isento de Soro tem de ser < 20 UL para h-tTG e DGP. Para a esfera anti-IgA o valor tem de ser < 5,0 UL e, para a esfera IgA, tem de estar entre 15 e 40 UL.
   d. A proporção das UL para Anti-IgA/IgA tem de ser > 0,50 para o QUANTA Plex™ Negative Control e o Celiac IgA Positive Control < 0,50 para o Controlo Isento de Soro.
   e. As esferas anti-IgA e IgA utilizam-se para detectar a deficiência selectiva de IgA e, para assegurar que os erros nos resultados falsos negativos do doente, decorrentes de erros operacionais, são detectados. Se qualquer uma das duas esferas de controlo tiver um resultado calculado inferior a 5 UL para qualquer doente em particular, na Versão IS 2,0 e superior aparecerá um resultado de Novo Teste.
      i. Existe a possibilidade de o doente ter a deficiência selectiva de IgA, se os resultados para anti-h-tTG e DGP forem negativos (que seja inferior a 20 UL) e a esfera anti-IgA for inferior a 5 UL, enquanto que ao mesmo tempo o valor da esfera de controlo IgA seja superior a 20 UL, apresentando uma proporção de anti-IgA UL/IgA UL 0,5. Tenha: em atenção que este mesmo resultado pode encontrar-se se o soro do doente não foi adicionado ao poço.
      ii. Se ambas as esferas anti-IgA e IgA forem inferiores a 5,0 UL, existe a possibilidade de não se ter adicionado o conjugado ao poço. O doente deve ser testado novamente para confirmar o resultado negativo.
5. QUANTA Plex™ Negative Control, O Celiac IgA Calibrator e Positive Control e as Controlo Isento de Soro para monitorizar falhas substanciais dos reagentes. O Positivo alto ENA Profile 5 não garante precisão no ponto de decisão do teste. O utilizador deve recorrer ao documento C24-A3 da CLSI ((anteriormente NCCLS) para obter instruções suplementares sobre as práticas do Controlo de Qualidade apropriadas.

Cálculo dos resultados

As MFI para todos os controlos e amostras do doente para cada antigénio e as duas esferas de controlo determinam-se em primeiro lugar. A reactividade, em UL, de uma determinada amostra para cada tipo de antigénio pode ser depois calculada através da fórmula que se segue. Divida a MFI da amostra pela MFI do Celiac IgA Calibrator para esse antigénio ou esfera de controlo e multiplique o resultado pelo número de ULs atribuídas ao Celiac IgA Calibrator para

esse antigénio. A UL valor do Calibrador para cada antigénio encontra-se no rótulo da caixa para esse lote do kit. O exemplo seguinte destina-se a determinar a reactividade anti-h-tTG. Utilize a fórmula equivalente para a esfera DGP e para as duas esferas de controlo.

$$\text{Valor da amostra (em UL)} = \frac{\text{MFI da Amostra para h-tTG}}{\text{MFI h-tTG Calibrator}} \times \text{Valor do h-tTG Calibrator (em UL)}$$

A reactividade do anticorpo em IgA para h-tTG e DGP pode então classificar-se de acordo com a tabela abaixo.

	UL
Negativa	< 20
Positiva fraca	20-30
Positiva	> 30

A reactividade está relacionada com a quantidade de auto-anticorpo presente na esfera, de forma não linear. Embora aumentos e diminuições das concentrações de anticorpos dos doentes se reflictam num aumento ou diminuição correspondentes da reactividade da fluorescência, a alteração não é proporcional (ou seja, uma duplicação da concentração de anticorpos não se reflecte numa duplicação da reactividade). Para além disso, a quantidade total de IgA no soro de um doente afecta a MFI determinada. Caso seja necessária uma quantificação mais rigorosa dos auto-anticorpos do doente, a amostra deve ser submetida a um teste quantitativo.

Interpretação dos resultados

A QUANTA Plex™ Assay consiste numa técnica extremamente sensível e tem capacidade para detectar pequenas diferenças em populações de doentes. Cada laboratório deve estabelecer o seu próprio intervalo do normal com base nas suas técnicas, controlos, equipamento e população de doentes, de acordo com os seus procedimentos estabelecidos.
Sugere-se que os resultados reportados pelo laboratório devam incluir a declaração: “Os resultados que se seguem foram obtidos com o INOVA QUANTA Plex™ Celiac IgA Profile. Valores obtiveram com métodos de ensaio de outros fabricantes não podem ser utilizados em substituição. A magnitude dos níveis de auto-anticorpos IgA reportados nem sempre pode estar correlacionada com um título de parâmetro de avaliação final.”

Para determinar se o doente tem quantidade suficiente ou insuficiente de IgA no seu soro, divida a UL da esfera anti-IgA pela UL da esfera IgA. Se o resultado for inferior a 0,5 e o doente for negativo para ambos anti-h-tTG e anti-DGP, o deve testar-se novamente a amostra para confirmar o resultado. Se se confirmar que o doente tem uma quantidade insuficiente de IgA, a amostra deve reflectir-se para os testes IgG anti-h-tTG e IgG anti-DGP. Se for necessária a confirmação de deficiência em IgA, a amostra deve testar-se num teste IgA quantitativo.

Limitações do método

1. A presença de imuno complexos ou de outros agregados de imunoglobulinas na amostra do doente podem causar um aumento do nível de ligação não-específica e produzir resultados falsos positivos neste ensaio.
2. Nem todos os doentes com doença celíaca e Dermatite Herpetiforme, h-tTG ou DGP IgA antibodies positivos.
3. Os resultados deste ensaio devem ser utilizados em conjunto com as conclusões clínicas e outros testes serológicos.
4. Não agitar adequadamente os controlos e/ou as amostras de soro diluidas, com as microesferas conservados na placa, pode aumentar os valores de %CV, em relação aos valores tipicos encontrados nos testes ELISA.
5. Depois da meia-hora de incubação com o conjugado fluorescente, ocorre um aumento de fluorescência de aproximadamente 10% por cada meia hora adicional ao tempo de incubação.
6. As características de desempenho do ensaio não foram determinadas para outras matrizes além do soro.
7. A falha na manutenção dos tempos de adição dos reagentes pode provocar um aumento “Front-to-back” das variações dos testes.

Valores esperados

A capacidade do teste QUANTA Plex™Celiac IgA Profile assay para detectar anticorpos anti-h-tTG e anti-DGP foi avaliada mediante comparação com testes ELISA disponíveis no mercado, comercializados pela INOVA Diagnostics, Inc. Os resultados do ELISA e de cada um dos testes de QUANTA Plex™ Celiac IgA Profile foram considerados positivos se a amostra do doente foi igual ou superior a 20 Unidades Luminex ou Unidades ELISA e negativos se foram inferiores a 20 UL ou EU.

Intervalo de valores normais

278 amostras de dadores de sangue saudáveis no teste QUANTA Plex™ Celiac IgA Profile. 277 amostras normais (99,6%) foram negativas na parte h-tTG do teste QUANTA Plex™. A amostra mais elevada apresentou um valor de 29 UL. O valor médio foi de 3,2 UL com um desvio padrão (DP) de 1,5. O cutoff foi de 11 DP acima da média. Todas, à excepção de 3 das 278 amostras normais (98,9%), foram negativas na porção de DGP do teste de QUANTA Plex™ Celiac IgA Profile. A amostra mais elevada apresentou um valor de 88 UL. Os memos amostras foi também positiva no DGP ELISA. Não incluindo a amostra duplamente positiva, o valor médio foi de 4,4 UL com um DP de 5,8. O cutoff foi de 2,7 DP acima da média.

Sensibilidade e Especificidade Clínica

Para determinar a sensibilidade clínica dos ensaios de anticorpos, testaram-se 29 amostras de doentes com a doença celíaca activa que tinham IgA suficiente no QUANTA Plex™ Celiac IgA Profile e nos ELISA correspondentes. A sensibilidade clínica para IgA anti-h-tTG foi de 93% (com um Intervalo de segurança de 95% [IS] de 77-99%). A sensibilidade clínica para IgA anti-DGP foi de 73% (IS de 95% de 53-92%). Para determinar a especificidade clínica, testaram-se 494 doentes que não foram diagnosticados com a doença celíaca. Este grupo incluiu os dadores de sangue normais, doentes com doenças reumáticas, hepáticas, gastrointestinais e infecciosas. A especificidade clínica para anti-h-tTG foi de 98%, com IS de 95% de 96%-99%. A especificidade clínica de anti-DGP foi também de 98% (95% IS de 96-99%).

A Sensibilidade e a Especificidade Clínica para os testes anti-h-tTG e DGP no Celiac IgA Profile

h-tTG IgA		Diagnóstico		
		Positivo (DC com IgA (suficiente e não numa dieta sem glúten)	Negativo (Controlos não diagnosticados com DC)	Tudo
Luminex	Positivo	27	11**	38
	Negativo	2*	483	485
	Tudo	29	494	523

*Ambas estas amostras foram negativas no tTG ELISA. ** Dez destes são positivos perto ELISA
Sensibilidade: 27/(27+2)x100 = 93,1% ([IS] 77-99%) Especificidage: 483/(11+483)x100 = 97,8% ([IS] 96-99%)

DGP IgA		Diagnóstico		
		Positivo (DC com IgA (suficiente e não numa dieta sem glúten)	Negativo (Controlos não diagnosticados com DC)	Tudo
Luminex	Positivo	18	12**	30
	Negativo	11*	482	493
	Tudo	29	494	523

* Dez destes são negativo perto ELISA. ** Dez destes são positivos perto ELISA.
Sensibilidade: 18/(18+11)x100 = 62,1% ([IS] 53-92%). Especificidage: 482/(12+482)x100 = 97,6% ([IS] 96-99%)

Comparação entre os Ensaios QUANTA Plex™ e ELISA

Calculou-se a percentagem total de concordância relativamente positiva, negativa (com Intervalos de Segurança de 95%) dos ensaios anticorpo do QUANTA Plex™ comparada com o ELISA para todas as amostras testadas e exibe-se nas tabelas abaixo.

h-tTG IgA		ELISA		
		Positivo	Negativo	Tudo
Luminex	Positivo	174	2	176
	Negativo	21	757	778
	Tudo	195	759	954

Concordância de percentagem de positivos: 174/(174+21)x100 = 89,2% (84-93%)
Concordância de percentagem de negativos: 757/(2+757)x100 = 99,7% (99-100%)
Concordância de percentagem global: (174+757)/(174+2+21+757)x100 = 97,6%

DGP IgA		ELISA		
		Positivo	Negativo	Tudo
Luminex	Positivo	136	4	140
	Negativo	31	783	814
	Tudo	167	787	954

Concordância de percentagem de positivos: 136/(136+31)x100 = 81,4% (75-87%)
Concordância de percentagem de negativos: 783/(4+783)x100 = 99,5% (99-100%)
Concordância de percentagem global: (136+783)/(136+4+31+783)x100 = 96,3%

Detecção de quantidade insuficiente de IgA

Os soros de 5 doentes conhecidos por terem a deficiência selectiva de IgA testaram-se no Celiac IgA Profile, tal como 949 outros doentes conforme acima descrito. Esses 5 mais 21 doentes suplementares apresentaram proporções no anti-IgA UL/IgA UL inferiores a 0,5 tendo assim IgA insuficiente para o Perfil de IgA Celíaco.

A Sensibilidade e a Especificidade para a proporção anti-IgA UL/IgA UL no QUANTA Plex™ Celiac IgA Profile

Positivo Controles N=5	QUANTA Plex™ Relação >0,5	QUANTA Plex™ Relação <0,5	Clínica Sensibilidade QUANTA Plex™ (95% CI)	Tudo Negativo Controles N=949	QUANTA Plex™ Relação >0,5	QUANTA Plex™ Relação <0,5	Clínica Especificidade QUANTA Plex™ (95% CI)
Anti-IgA/IgA Relação	0	5	100% (82-100%)**	Anti-IgA/IgA Relação	928	21*	99% (98-100%)**

*Com base em parâmetros sorológicos, 12 destes doentes aparentavam ser Doentes Celíacos com deficiência em IgA e 7 tinham controlos altamente diluídos e 1 era conhecido por ter um baixo nível total de IgA no soro. Com base numa incidência de 1 em 500 IgA deficient, esperava-se que 2 amostras adicionais fossem positivas pela incidência taxa.
**Cálculos baseados em 18 soros supostamente deficientes.

Precisão e Reprodutibilidade

Variação intra-ensaio e variação inter-ensaio. Para a variação intra-ensaio, ensaiaram-se 18 amostras 10 vezes cada num único ensaio. Na tabela abaixo lista-se a variação de 3 para 5 amostras representativas para cada teste. Para a variação inter-ensaios, analisaram-se 20 amostras em 6 testes executados em 6 dias diferentes. Na tabela abaixo lista-se a variação de 3 para 5 amostras representativas para cada teste.

Variação intra-ensaio			**Variação inter-ensaios**		
Antígeno	Média LU	% C.V.	Antígeno	Média LU	% C.V.
h-tTG	22	6%	h-tTG	23	9%
h-tTG	23	7%	h-tTG	26	8%
h-tTG	31	7%	h-tTG	31	8%
h-tTG	89	9%	h-tTG	102	3%
h-tTG	255	4%	h-tTG	263	3%
DGP	17	12%	DGP	19	4%
DGP	22	8%	DGP	23	11%
DGP	25	8%	DGP	26	5%
DGP	59	4%	DGP	65	9%
DGP	38	8%	DGP	44	9%
anti-IgA	5	5%	anti-IgA	5	8%
anti-IgA	11	4%	anti-IgA	11	5%
anti-IgA	20	2%	anti-IgA	20	5%
IgA	27	5%	IgA	28	4%
IgA	10	4%	IgA	10	5%
IgA	21	2%	IgA	23	4%

Referências

1. Trier JS: Celiac Sprue: N Engl J Med 325: 1709-1719, 1991.
2. Strober W: Gluten-sensitive enterophy: A nonallergic immune hypersensitivity of the gastrointestinal tract. J. Allergy Clin. Immunol. 78: 202-211, 1986.
3. McMillan SA, Haughton DJ, Biggart JD, et al.: Predictive value for coeliac disease of antibodies to gliadin, endomysium and jejunum in patients attending for jejunal biopsy. BMJ 303: 1163-1165, 1991.
4. Valdimarsson T, Franzen L, Grodzinsky E, et al.: Is small bowel biopsy necessary in adults with suspected celiac disease and IgA anti-endomysial antibodies? 100% positive predictive value for celiac disease in adults. Digestive Diseases and Science 41: 83-87, 1996.
5. Walker-Smith JA, Guandalini S, Schmitz J, et al.: Revised criteria for diagnosis of celiac disease: Report of working group of European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition (ESPGAN). Arch Diseases of Childhood 65: 909-911, 1990.
6. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, et al.: Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. Nature Medicine 3: 797-801, 1997.
7. Sardy M, Odenthal U, Karpati S, et al.: Recombinant human tissue transglutaminase ELISA for the diagnosis of gluten-sensitive enteropathy. Clin Chem 45: 2142, 1999.
8. Sblattero D, Berti I, Trevisiol C, et al.: Human recombinant tissue transglutaminase ELISA : an innovative diagnostic assay for celiac disease. Am J Gastroenterology 95: 1253-1257, 2000.
9. Osman AA, Günnel T, Dietl A, et al.: B-Cell epitopes of gliadin. Clin Exp Immunol 121: 248-254, 2000.
10. Aleanzi M, Demonte AM, Esper C, et al.: Celiac disease: Antibody recognition against native and selectively deamidated gliadin peptides. Clin Chem 47: 2023-2028, 2001.
11. Schwertz E, Kahlenberg F, Sack U, et al.: Serologic assay based on gliadin-related nonapeptides as a highly sensitive and specific diagnostic aid in celiac disease. Clin Chem 50: 2370-2375, 2004.
12. Prince HE: Evaluation of the INOVA Diagnostics enzyme-linked immunosorbent assay kits for measuring serum immunoglobulin G (IgG) and IgA to deamidated gliadin peptides. Clin Vaccine Immunol 13: 150-151, 2006.
13. Sugai E, Vazquez H, Nachman F, et al.: Accuracy of testing for antibodies to synthetic gliadin-related peptides in celiac disease. Clin Gastroenterol Hepatol 4: 1112-1117, 2006.
14. Collin P, Maki M, Keyrilainen O, et al.: Selective IgA deficiency and celiac disease. Scand J Gastroenterol 27: 367-371, 1992.
15. Cataldo F, Marino V, Ventura A, et al.: Prevalence and clinical features of selective immunoglobulin A deficiency in coeliac disease: an Italian multicentre study. Gut 42: 362-365, 1998.
16. Fernandez E, Blanco C, Garcia S, et al.: Use of low concentrations of human IgA anti-tissue transglutaminase to rule out selective IgA deficiency in patients with suspected celiac disease. Clin Chem 51: 1014-1016, 2005.
17. Dahlbom I, Olsson M, Forooz NK, et al.: Immunoglobulin G (IgG) anti-tissue transglutaminase antibodies used as markers for IgA-deficient celiac disease patients. Clin Diag Lab Immunol 12: 254-258, 2005.
18. Chorzelski TP, Sulej J, Tcherzewska H, et al.: IgA class endomysium antibodies in dermatitis herpetiformis and celiac disease. Ann NY Acad Sci 420: 325-334, 1983.
19. Martins TB, Burlingame R, von Mühlen CA, et al.: Evaluation of multiplexed fluorescent microsphere immunoassay for detection of autoantibodies to nuclear antigens. Clin Diagn Lab Immunol 11: 1054-1059, 2004.
20. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories: Centers for Disease Control/National Institutes of Health, Fifth Edition, 2007.

Fabricado por:

INOVA Diagnostics, Inc.
9900 Old Grove Road
San Diego, CA 92131
United States of America

Representante Autorizado:

Medical Technology Promedt Consulting GmbH
Altenhofstrasse 80
D-66386 St. Ingbert, Germany
Tel.: +49-6894-581020
Fax.: +49-6894-581021
www.mt-procons.com

CE

Technical Service 888-545-9495
628940 July 2007
Revision PRT0